

⑫ 公開特許公報 (A) 平2-289596

⑬ Int.Cl.⁵
 C 07 H 21/00
 C 12 N 15/10
 C 12 P 19/34

識別記号 庁内整理番号
 Z 7822-4C
 Z 8214-4B

⑭ 公開 平成2年(1990)11月29日

審査請求 未請求 請求項の数 15 (全20頁)

⑮ 発明の名称 核酸の単離方法

⑯ 特 願 平2-75323

⑰ 出 願 平2(1990)3月23日

優先権主張 ⑲ 1989年3月23日 ⑳ オランダ(NL) ㉑ 8900725

㉒ 発 明 者 ウィレム・レネ・ボーデルデエイクストラート・28・デ・デルデム

㉒ 発 明 者 ヘンリエツテ・マリア・ア・アレイダ・アドリーンセ

㉓ 出 願 人 アクゾ・エヌ・ヴェー オランダ国、6824・ベー・エム・アーネム、フエルベルウェヒ・76

㉔ 代 理 人 弁理士 川口 義雄 外2名
最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

核酸の単離方法

2. 特許請求の範囲

(1) 核酸を含有する出発材料から核酸を単離するための方法であって、出発材料、カオトロビック物質及び核酸結合性固相を混合し、核酸が結合した固相を液体から分離し、その後、こうして得られた固相-核酸複合体を洗浄し、必要に応じて核酸を該複合体から溶離することを特徴とする方法。

(2) 使用される出発材料が全血、血清、バフィーコート、尿、糞便、脳脊髄液、精液、唾液、組織及び細胞培養物のような、核酸を含有する生物材料であることを特徴とする請求項1に記載の方

法。

(3) 使用されるカオトロビック物質がグアニジニウム塩、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、

(イソ)チオシアノ酸ナトリウム、尿素又はその相互の組み合わせから構成される群から選択されることを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。

(4) グアニジニウム塩が(イソ)チオシアノ酸グアニジニウムであることを特徴とする請求項3に記載の方法。

(5) 使用される核酸結合性固相がシリカ粒子、ポリマー材料、フィルター材料、ポリスチレンビーズ又はニトロセルロース紙から構成される群から選択されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

(6) DNA及び/又はRNAを単離することを特徴とする請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

(7) 実質的に0.05~500μmの範囲の粒径を有するシリカ粒子を使用することを特徴とする請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

(8) 実質的に0.1~200μmの範囲の粒径を有するシリカ粒子を使用することを特徴とする請求項1

から6のいずれか一項に記載の方法。

(9) 実質的に1~200μmの範囲の粒径を有するシリカ粒子を使用することを特徴とする請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

(10) 得られた固相-核酸複合体を沈澱させ、かつ上清を廃棄することにより分離し、その後、カオトロビック物質を含有する洗浄用緩衝液で複合体を洗浄することを特徴とする請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

(11) 洗浄用緩衝液で洗った固相-核酸複合体を更に1種以上の有機溶剤で洗浄し、その後、乾燥することを特徴とする請求項10に記載の方法。

(12) 洗浄及び乾燥した固相-核酸複合体中に存在する核酸を溶離用緩衝液により溶離することを特徴とする請求項11に記載の方法。

(13) こうして得られた該固相-核酸複合体を複数の成分の混合物と接触させ、該固相に結合しているか又は該固相から溶離した核酸を増幅すること

とを特徴とする請求項1に記載の方法。

(14) 請求項1に記載の方法を実施するための手段の組み合わせ。

(15) 請求項13に記載の方法を実施するためのテストキット。

3. 発明の詳細な説明

本発明は核酸を含有する出発材料から核酸を単離するための方法及び手段の組み合わせ、並びに該方法により得られた核酸を增幅(¹⁵amplify)するためのテストキットに係る。より特定的には、本発明は全血、血清、パフィーコート(血液の炎症性痴皮又は白血球フラクション)、尿、糞便、脳脊髄液、精液、唾液、組織、細胞培養物等のような、核酸を含有する生物材料から核酸を単離するための方法及びキットに係る。上記生物材料から単離された核酸は、サンプルを採取した生物に内在する核酸及び外来性(ウイルス、真菌、細菌又は寄生虫に由来する)核酸も含有し得る。

全血、血清、尿又は糞便のような複雑な出発材料から核酸(NA)を単離する既知の方法は通常、タンパク質分解酵素の存在下で生物材料を洗剤により溶解させた後、有機溶剤(例えばフェノール及び/又はクロロホルム)で数回抽出し、エタノール沈降させ、核酸を透析することにより実施される。例えば臨床材料から(二重鎖)DNAを単離するこれらの既知の方法は多大な労力と時間を必要とする。このような出発材料からNAを精製するためには比較的多数の段階が必要とされるので、数個の臨床サンプルを同時に処理する場合、サンプル間にNAが伝播される危険が大きい。核酸増幅法、例えば最も感受性の高いポリメラーゼ鎖反応(PCR, Saiki他、*Science* 230, 1985, 1350)により例えば病原体(例えばウイルス又は細菌)におけるNAの存在を後で検出するためにNAを単離する場合、このように異なるサンプル間でNAが伝播される危険が大きいと、誤って陽性の結果が生じ、重大な問

題である。

汚染に対して感受性のこのような既知の方法の1例は、組織及び細胞培養物から全RNAを単離するための方法として*Analytical Biochemistry* 162, 1987, 156に記載されている方法である。この方法によると、生物出発材料からRNAを酸性チオシアニ酸グアニジニウム-フェノール-クロロホルム混合物で1回抽出する。相分離後、更に水相を処理することにより有用な条件下で4時間以内にRNAを回収することができる。

Analytical Biochemistry 162, 1987, 463には、塩酸グアニジンを含有する緩衝液に細胞を分散し、エタノール沈降させることにより、組織及び細胞系からDNAを単離するための方法が記載されている。この方法は汚染に対して感受性であるが、分離したDNAを更に処理してから数時間以内に有用なNA産物を単離することができる。

しかしながら、これらの既知の方法は複雑な出

発材料(例えば全血及び血清)中では首尾よく使用することができない。

本発明の目的は、既知の方法の欠点を解消するような方法を提供することである。

より特定的には本発明の目的は、種々の生物材料のような複雑な出発材料から核酸(即ちDNA及び/又はRNA)を未曾有の迅速さで簡単且つ再現可能に、しかもその後、分子生物学反応における反応剤として使用可能な非損傷状態及び高純度で直接(前処理を介さずに)単離することが可能な方法を提供することである。

本発明の別の目的は、他のサンプル及び人体に対する汚染の危険が低いという点で既知の方法と異なり、即ち異なるサンプル間におけるNAの伝播の危険を最小にしながら数個の臨床サンプルを同時に処理することが可能な方法、並びに被処理サンプル中に存在し得るウイルス又は細菌が人体に伝染する危険を最小にすることが可能な手段を提

適用できる。しかしながら、核酸含有生物材料の種類によっては(例えば植物材料、ある種のグラム陽性菌並びにある種の酵母及びカビ)は特殊な細胞壁構造によりカオトロピック物質に溶解しないため、出発材料として本発明の方法で直接使用することはできない。従って、このような出発材料は入手形態の細胞に前処理を施す必要があり、例えば予め細胞を溶解させてから得られた溶解物に本発明の方法を実施すればよい。

核酸(NA)なる用語は、任意の可能な構造、即ち二重鎖(ds)核酸、又は一重鎖(ss)核酸、又はその組み合わせ(部分的ds又はss)としてのDNA及びRNAを意味する。

本発明の主眼は、カオトロピック物質の存在下でNAと結合することが可能な核酸結合性固相、例えばシリカ粒子を使用する点にある。シリカなる用語は、 SiO_2 結晶及び他の形態の酸化ケイ素、 SiO_2 から構成されるケイソウ植物の骨格、無定形

供することである。

これらの目的は本発明に従い、出発材料をカオトロピック物質及び核酸結合性固相と混合し、核酸が結合した固相を液体から分離し、その後、こうして得られた固相-核酸複合体を洗浄し、必要に応じて核酸を該複合体から溶離することを特徴とする、核酸を含有する出発材料から核酸を単離するための方法により実現される。

広義には本発明はあらゆる核酸含有出発材料(ウイルス又は細菌に感染した食品及び類似製品、ワクチン及びミルクを含む)に適用できるが、使用される出発材料が全血、血清、バフィーコート、尿、糞便、脳脊髄液、精液、唾液、組織及び細胞培養物(例えば哺乳動物細胞培養物及び細菌培養物)のような核酸含有生物材料であるような方法に特に適用される。当然のことながら、本発明の方法はPCR産物又は更に精製を要する別の核酸回収方法の産物のような比較的純粋な出発材料にも

酸化ケイ素並びにガラス粉末を意味する。アルキルシリカ、ケイ酸アルミニウム(ゼオライト)、-NH₂を有する活性シリカ、ラテックス粒子、キュベットもしくは微量滴定プレートの内壁を形成するある種のポリマー材料、又は例えばニトロセルロースから構成されるフィルター材料も本発明の核酸結合性固相として使用できる。

シリカ粒子の使用に関しては、カオトロピック塩NaI(ヨウ化ナトリウム)の高濃度溶液中のdsDNAをアガロースから遊離させ、ガラスに結合できることがPNAS 76, 1979, 615により知見された。この文献はアガロースゲルからDNAを単離するための2種の方法について記載しており、そのいずれも第1段階でアガロースを溶解するためにNaI溶液を使用している。一方の方法では第2段階でDNAをアセトンで沈降させ、他方の方法では第2段階でDNAをガラス粒子に結合し、その後、水性緩衝液に溶離する。しかしながら、この方法では

体液及び他の生物出発材料のような複雑な出発材料を使用できない。更にこの論文は、本発明の1段階方法については開示していない。

本発明によると、結合し、その後、溶離される高純度の核酸を不純な出発材料から直接得られるように、適当に選択した粒径を有するシリカ粒子を使用することが好ましい。

本発明の好適態様は、実質的に0.05~500μmの範囲の粒径を有するシリカ粒子を使用することを特徴とする。「実質的に」なる用語は、シリカ粒子の80%以上、好ましくは90%が規定された粒径範囲に該当することを意味する。結合したNAを容易に処理できるようにするためには、使用されるシリカ粒子は実質的に0.1~200μmの範囲の粒径を有すると好適であり、使用されるシリカ粒子が実質的に1~200μmの範囲の粒径を有するような方法が最適である。実際に、シリカ粒子のNA結合能は粒子が小さければ小さいほど高いが、特にNA含有量

ター形態であるか、又はサンプルとカオトロピック物質とを収容する容器の一部を形成する。NA結合性固相を後者の形態に選択すると、その後のサンプル処理及びNA単離のために遠心分離又は汎過を実施する必要がなくなる。

本発明によると、シリカ粒子のような上記核酸結合性固相以外にカオトロピック物質を使用することが不可欠である。カオトロピック物質なる用語は、タンパク質及び核酸の二次、三次及び/又は四次構造を変えることが可能であり且つ少なくとも一次構造を無傷にしておくことが可能な任意の物質を意味する。具体例は(イソ)チオシアノ酸グアニジニウム及び塩酸グアニジンである。核酸を含有する出発材料からNAを単離するために、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、(イソ)チオシアノ酸ナトリウム、尿素又はその相互の組み合せも核酸結合性固相と組み合わせて使用すると非常に好適である。本発明によると、使用されるカ

の高い出発材料の場合、及びNA分子が比較的長い場合は、過度に小さいシリカ粒子を使用すると、形成されるNA-シリカ複合体をそれ以上有効に再分散することができなくなる。換言するならば、結合したNAを純粋な形で複合体から回収することができない。人血を出発材料として使用する場合、0.2~10μmの範囲の粒径を有する非分画シリカを使用すると、このような問題が生じることがある。それ以上再分散することができない凝集物の形成は、粒径が1~10μmの範囲の分画したシリカを使用することにより避けることができる。しかしながら、細菌培養物のように細胞中の濃度が高い出発材料を使用する場合、このような粗いシリカフラクションの使用は再分散し難い凝集物の形成を避けるためには不十分であり、2~200μmの粒径を有するケイソウ土のようなもっと粗いシリカを使用すると、最適の結果が得られることが判明した。

別の好適態様によると、NA結合性固相はフィル

オトロピックグアニジニウム塩は好ましくはチオシアノ酸グアニジニウム(GuSCN)である。

本発明は通常、出発材料を十分大きい量のカオトロピック物質(例えばグアニジニウム塩)及び例えばシリカ粒子と混合し、出発材料中に存在する核酸のほぼ全体を遊離させ、該シリカ粒子に結合させるように実施される。適当なプロトコールによると、例えば、反応容器中に存在するGuSCN緩衝溶液にシリカ粒子懸濁液を加え、その後、サンプルを加えて十分に混合する。やがて、細胞が溶解し、ウイルスが存在する場合はウイルスも溶解し、遊離したNAがほとんど即座にシリカ粒子に結合する。次に、形成されたシリカ-核酸複合体を例えば迅速沈澱(遠心分離)及び上清の廃棄(例えば吸引による)により液体から分離し、その後、複合体(例えばシリカ-核酸ペレットの形態)を例えばポルテックスミキサーを使用してカオトロピックグアニジニウム塩を含有する洗浄用緩衝液で洗

浄(再分散又は均質化)し、再び沈澱させる。好ましくは、洗浄用緩衝液で洗ったシリカ-核酸複合体を更にアルコール水溶液(収率の損失を制限するため最適には約70%エタノール)及びアセトンで洗い、その後、(例えば加熱下に)乾燥してアセトンを除去する。次に、洗浄及び乾燥したシリカ-核酸複合体中に存在するNAを水性溶離用緩衝液(elution buffer)により溶離する。溶離用緩衝液の選択は単離されるNAの使用目的に応じて決定される。適当な溶離用緩衝液の例はTE緩衝液、2回蒸留水(aqua bidest)及びPCR緩衝液('材料及び方法'の項参照)である。好ましくは、これらの全段階を单一の反応容器(例えば容量1.5mlのポリプロピレン製エッペンドルフチューブ)中で実施し、比較的少量、例えば100μl未満の精製NAを回収する。こうして単離したNAは核酸分解酵素を含有せず、DNAポリメラーゼ(例えばTaq-DNAポリメラーゼ)、DNA制限酵素、DNAリガーゼ及び逆転写酵素(例

えばAMV逆転写酵素)のような種々の酵素の基質として直接使用できるような高純度を有する。

本発明の方法によると、PCR法又はヨーロッパ特許第EP0329822号に記載されている所謂NASBA法(NASBA=核酸配列に基づく増幅)のような増幅方法によりNA配列を証明できる程に、例えば血漿及び血球を予め分離することなく約45分間に50μlの全血から十分な量のNAを単離することができる。一方、本発明は血清、糞便、尿等のようなNAを含有する他の種々の生物材料にも適用することができる。このため、本発明は細菌及びウイルス感染の診断において、並びに出生前診断及び遺伝性腫瘍体質の診断の領域における遺伝的多形性の研究において有用である。

本発明のNA単離方法は、全手順を单一の反応容器中で実施することができ、方法の第1段階で粗出発材料から遊離したNAが完全な別の精製過程の間に少なくとも固相の大部分に結合するので、汚

染の危険が非常に低い。ウイルス又は細菌に感染している可能性のある材料の処理に伴う人体への危険は、サンプルを反応容器に入れる単離過程の第1段階にはほぼ限定される。この第1の処理において、潜在的に存在する病原体は有効に不活化される。本発明の方法は特殊な周辺技術(ボルテックスマキサー、12000gエッペンドルフ型の遠心分離機及び水浴又はエッペンドルフ加熱ブロックが標準実験技術に属する)も生化学の専門的知識も必要としないので、多数のサンプルから機械的にNAを単離するため、換言するなら自動化に非常に適している。本発明の方法を使用すると、10個以上、あるいは24個以上の異なるサンプルを約1時間で処理することができる。

本発明は核酸を含有する出発材料から核酸を単離するための方法のみならず、そのための手段の組み合わせ及び該方法により得られた核酸を増幅するためのテストキットにも係る。

1態様によると、本発明の手段の組み合わせは、(a)(イソ)チオシアニ酸グアニジニウムを含有する溶解用緩衝液(lysis buffer)、(b)実質的に0.05~500μm、好ましくは0.1~200μm、最適には1~200μmの範囲の粒径を有するシリカ粒子の水性懸濁液、(c)(イソ)チオシアニ酸グアニジニウムを含有する洗浄用緩衝液、及び必要に応じて(d)溶離用緩衝液を含む。

即ち、本発明の手段の組み合わせは例えば次の4成分、即ち

成分1: (イソ)チオシアニ酸グアニジニウム緩衝溶液、

成分2: シリカ粒子の懸濁液、

成分3: 洗浄用緩衝液、及び(場合によって)

成分4: 溶離用緩衝液

から構成され得る。

必要に応じて成分1及び2と一緒にしてもよいが、その場合、貯蔵寿命が制限される。

本発明のNA単離方法で使用することが好ましい他の反応剤、例えばエタノール及びアセトンは標準実験技術に属する。

以下、多数の実施例により本発明を説明する。先ず、使用される材料と方法について説明する。

(以下余白)

材料及び方法

1)シリカ粗材(SC)の懸濁液

粒径分布0.5~10μmで且つその80%が1~5μmの、Sigma製の二酸化ケイ素(SiO₂)を使用した。

シリカ80gを直径5cmのシリンダーに入れた2回蒸留水(最高500ml)中に懸濁させると、水柱の高さは27.5cmとなった。室温で25時間1x g沈降させた後に、70mlを残して上澄みを吸引して除去した。2回蒸留水を500mlになるまで加え、シリンダーを振盪することにより粒子を再度懸濁させた。5時間1x g沈降させた後、60mlを残して上澄みを吸引して除去した。32%(w/v)HCl600μlを加えた後、渦形成することにより再度懸濁させた。この懸濁液を6ml容器に入れて4mlアリコートをつくり、密封し、オートクレーブ内で121°Cで20分間加熱した。この沈降プロトコルによって、粒径1μm以上より大きなシリカ粒子を豊富に得ることができた。これは電子顕微鏡検査によって立証さ

れた。更に、酸性(pH約2)のシリカをオートクレーブ処理すると、任意に存在する核酸が完全に分解される結果となる。このように得られたシリカ粗材の懸濁液を以下SCと表記する。

シリカ誘導体の懸濁液

2~18個の炭素原子の長さのアルキル末端を有するメチルアクリルアミド二酸化ケイ素を用いてシリカを誘導体化した。誘導体化したシリカの粒径は63~200μmであった。使用した粒子の孔径は500Åであった。上記シリカ誘導体(12MAMC₂-C₁₈)はDiosynth, Ossから供給された。

NA単離のために(実施例II1)、誘導体化したシリカ粒子0.5gを2回蒸留水1ml中に懸濁させた。このシリカ懸濁液を、32%(w/v)HCl 120μlを用いて90°Cで30分間予備処理した。

ポリスチレンラテックス粒子の懸濁液

2種類のポリスチレンラテックス粒子を使用した。ポリスチレンラテックスVQ69レッドはナトリ

ウムードデシルスクシネートスルフェート基を吸収させてあり、粒径は424nmを有した。ポリスチレンラテックスVQ58Bはより小さい粒径(328nm)を有し、外側にスルフェート基を吸収していなかつた。

3種の親水性のグリシジルメタクリレートポリスチレンラテックス粒子を使用した。ACF27C、ACN3レッド及びACY1515の粒径はそれぞれ933nm、206nm及び846nmであった。上記全てのポリスチレン粒子はARLA-Arnhemより供給のものであった。

市販フィルター

以下のものを使用した。

1. PVDF Millipore提供のImmobilon Transfer Membrane(疎水性)、
2. Schleicher and Schuell提供のNitrocellulose(0.2μm 参照番号401.398)、
3. Hybond-N Amersham提供のNylon Hybridization膜(0.45ミクロン、ロット:16872)。

D) L2緩衝液

TRIS(Boehringer)12.1gを2回蒸留水800mL中に溶解し、37% (w/v) HCl 8.1mLを加え、さらに容積1リットルになるまで2回蒸留水を加えることにより、L2緩衝液(0.1M Tris.Cl, pH 8.4)を調製した。

C) 洗浄液L2

CuSCN(Fluka製のチオシアノ酸グアニジン)120gをL2緩衝液100mL中に溶解することにより、洗浄液L2を調製した。

洗浄液L2*

KI(Merck製のヨウ化カリウム)12.45gをL2緩衝液25mL中に溶解することにより洗浄液L2*を調製した。

NaIベースのカオトロビック物質を調製するため、NaI(Merck製のヨウ化ナトリウム)11.25gをL2緩衝液25mL中に溶解した。チオシアノ酸ナトリウムベースのカオトロビック物質を調製するため

E) 溶解用緩衝液L6

CuSCN120gをL2緩衝液100mL中に(60°Cの水浴中で静かに振盪させて)溶解し、次いで0.2M EDTA pH 8 22mL及びTriton X-100(Packard)2.6gを加え、次に溶液を均質化することにより、溶解用緩衝液L6を調製した。

溶解用緩衝液L6*

KI(ヨウ化カリウム、Merck)12.45gをL2緩衝液25mL中に(40°Cの水浴中で静かに振盪させて)溶解し、次いで0.2M EDTA(pH 8.0)5.5mL及びTriton X-100(Boehringer 789704)0.65gを加え、最後にこの溶液を均質化することにより、溶解用緩衝液L6*を調製した。同じ方法を適用してNaI(ヨウ化ナトリウム、Merck)を含む溶解用緩衝液L6*、及びNaSCN(チオシアノ酸ナトリウム、Baker)を含む溶解用緩衝液L6*を調製した。

KI及び尿素を併有する溶解用緩衝液L6*を、KI(ヨウ化カリウム、Merck)12.45g及び尿素(Gibco BRL)

に、NaSCN(Baker)6.1gをL2緩衝液25mL中に溶解した。

KI及び尿素(8M)を含有するカオトロビック物質を調製するため、KI 12.45g及び尿素12.0gをL2緩衝液(25mL)中に溶解した。同様に、尿素及びNaIを併有するカオトロビック物質と、尿素及びNaSCNを併有するカオトロビック物質とを調製した。

D) 溶解用緩衝液L5

CuSCN 120gをL2緩衝液100mL中に(約60°Cの温水浴中で静かに振盪させて)溶解し、次いで40% (w/v) デキストラヌルフェート(Pharmacia LKB)溶液26.0g、0.2M EDTA pH 8 22mL及びTriton X-100(Packard)2.6gを加え、次に溶液を均質化することにより、溶解用緩衝液L5を調製した。0.2M EDTA pH 8 溶液は、EDTA37.2g(Merck製のTitriplex)37.2g及びNaOH(Merck)4.4gを水500mL中に溶解することにより調製した。

12.0gをL2緩衝液25mL中に溶解することにより調製した。次いで、0.2M EDTA(pH 8.0)5.5mL及びTriton X-100(Boehringer)0.65gを加え、この混合物を均質化した。同じ方法を使用してNaI/尿素及びNaSCN/尿素を調製した。

F) 溶解用緩衝液GEDTA

GEDTAとは、CuSCN 120gを0.2M EDTA pH 8 100mL中に溶解した溶液を意味する。

G) TE緩衝液

溶出(elution)に適した緩衝液は、所望であればRNAsin(Promega)0.5U/μLを含有する、pH 7.5の10mM Tris.Cl、1mM EDTA溶液(TE緩衝液)である。

H) 試験管

溶解用緩衝液900μL及びNAキャリヤ(ラテックスビーズもしくはSCのごときシリカ、または珪藻土)40μLをEppendorff遠心分離管(タイプ3810、1.5mL)に加えることにより、抽出過程と同じ日に試験管を準備した。

I) 洗浄方法

洗浄液1mlを加え、次いでペレットが再度懸濁するまで渦形成し、12000×gで15秒間遠心分離し、更に吸引によって上澄みを廃棄することにより、ペレットを洗浄した。

J) 溶出方法

溶出は、少なくとも25μl、好ましくは少なくとも40μlの溶出用緩衝液を加え、短時間(2秒間)渦形成し、56℃で10分間インキュベートすることにより実施した。

K) プロトコルB

このプロトコルは、ヒト血清、全血、水様便または尿といった複合出発材料からdsDNAを単離するのに適しており、GEDTA 900μl及びSC 40μlを含むEppendorff試験管を使用した。

1. ペレットが再度懸濁するまで試験管に渦形成し、
2. 出発材料(例えば血清、全血、便または尿)50

Eppendorff試験管を使用した。

1. ペレットが再度懸濁するまで試験管に渦形成し、
2. 出発材料(血清、全血、便または尿)50μlを加え、直ぐに渦形成(約5秒間)して均質化し、
3. 室温に10分間放置し、5秒間渦形成し、
4. 12000×gで15秒間遠心分離し、吸引によって上澄みを廃棄し、
5. ペレットをL2で2回洗浄し、
6. ペレットを70%エタノールで2回洗浄し、
7. ペレットをアセトンで1回洗浄し、
8. ペレットを、蓋を開放して56℃で10分間乾燥し、
9. 必要によってはRNasinの存在下に、TE緩衝液50μlを用いてNAを溶出し、
10. 12000×gで2分間遠心分離すると、上澄みはNAを含有した。

プロトコルY*

μlを加え、直ぐに渦形成して(5~10秒間)均質化し、

3. 室温に10分間放置し、5秒間渦形成し、
4. 12000×gで15秒間遠心分離し、吸引によって上澄みを廃棄し、
5. ペレットをGEDTAで1回洗浄し、
6. ペレットを70%エタノールで2回洗浄し、
7. ペレットをアセトンで1回洗浄し、
8. ペレットを、蓋を開放して56℃で10分間乾燥し、
9. RNasinを含まないTE緩衝液50μlを用いてNAを溶出し、

10. 12000×gで2分間遠心分離すると、上澄みはNAを含有した。

L. プロトコルY

このプロトコルは、ヒト血清、全血、水様便または尿といった複合出発材料からNAを単離する(同時にdsDNA、ssDNA、dsRNA及びssRNAを精製する)のに適しており、L6 900μl及びSC 40μlを含む

このプロトコルは、ヒト血清、尿またはバクテリア培養液といった複合出発材料からNAを単離するのに適している。

方法:

L6* 900μl及びSC 40μlを含むEppendorff試験管を使用した。

1. ペレットが再度懸濁するまで試験管に渦形成し、
2. 出発材料(血清一プラスミド、尿一プラスミド混合物または一晩培養したバクテリア培養液)50μlを加え、直ぐに渦形成(5秒間)して均質化し、
3. 混合しながら室温に10分間放置し、
4. 14,000 gで15秒間遠心分離し、吸引によって上澄みを廃棄し、
5. ペレットをL2*洗浄液で2回洗浄し、
6. ペレットを70%エタノールで2回洗浄し、
7. ペレットをアセトンで1回洗浄し、
8. ペレットを、蓋を開放して56℃で10分間乾燥

し、

9. 必要によってはRNAsinの存在下に、TE緩衝液(10mM Tris-1mM EDTA pH8.0)50μlを用いてNAを溶出し、

10. 14,000×gで2分間遠心分離すると、上澄みはNAを含有した。

プロトコルY**

このプロトコルは、カオトロビック物質としてのCuSCN、及びNAを結合できるフィルター(材料及び方法の項参照)の存在下に、NAを単離するのに適している。NA検出は、このフィルターをポリメラーゼ連鎖反応混合物に直接適用することによる、ポリメラーゼ連鎖反応によって実施し、従ってフィルターからNAを予め溶出しない。

方法：

L6溶解用緩衝液900μl及びフィルター(寸法1cm/1cm)を含むEppendorff試験管を使用した。

1. 核酸含有溶液50μlを加え、試験管を短時間渦

1. ベレットが再度懸濁するまで試験管に渦形成し、
2. 出発材料(血清、全血、便または尿)50μlを加え、直ぐに渦形成(約5秒間)して均質化し、
3. 室温に10分間放置し、5秒間渦形成し、
4. 12000×gで15秒間遠心分離し、吸引によって上澄みを廃棄し、
5. ベレットをL2で2回洗浄し、
6. ベレットを70%エタノールで2回洗浄し、
7. ベレットをアセトンで1回洗浄し、
8. ベレットを、蓋を開放して56°Cで10分間乾燥し、
9. 必要によってはRNAsinの存在下で、TE緩衝液50μlを用いてNAを溶出し、
10. 12000×gで2分間遠心分離すると、上澄みはNAを含有した。

N)出発材料

実施例は、出発材料の性質に応じて(特にセク

形成し、

2. 混合しながら室温に10分間放置し、

3. 上澄みを廃棄し、

4. フィルターをL2洗浄液で2回洗浄し、

5. フィルターを70%エタノールで2回洗浄し、

6. フィルターを、蓋を開放して56°Cで10分間乾燥し、

7. フィルターの小片をポリメラーゼ連鎖反応溶液に直接加えた。

M)プロトコルZ

このプロトコルは、ヒト血清、全血、水様便または尿といった複合出発材料からNAを単離するのに適しており、L5 900μl及びSC 40μlを含むEppendorff試験管を使用した。単離したNAはハイブリッド形成反応に使用することができるが、制限酵素に対する基質としてはやや適当でない。しかしながらT4 DNAリガーゼは活性である。プロトコルYと比較してプロトコルZではNAの収率が高くなる。

ションA～D)、以下のようなセクションに分割した。

セクションA:ヒト血清

セクションB:ヒト全血

セクションC:ヒト尿

上記セクションA、B及びCは特に、dsDNA及びssRNAの両方を純粹形態で単離できることを示す意味がある。

セクションD:ヒト便

このセクションDは、特にdsRNAも単離できることを示す。

セクションE:一重鎖DNA

このセクションEは、本発明が、ssDNAを単離するために使用できることを示す実験からなる。

セクションF:珪藻土

このセクションFは、珪藻土の骨格が本発明に使用するシリカ粒子として非常に有効であることを示す。更に、本発明が、種々のグラム陰性菌か

らNAを単離するために使用できることも示す。

セクションGは、種々のカオトロビック物質を使用し、細菌細胞からNAを精製できることを示す。

セクションH及びIは、別の固相を使用するDNAの単離を示す。

常に50μlの量で使用した。セクションB及びFに使用した血液は常に、凝固を防止するためにEDTAの存在下に採取した鮮血とした(Terumo N.V., Louvain,ベルギーのVenoject装置、タイプVT-574 TKZの採取管を使用)。他のセクションに使用した出発材料(血清、尿及び便)は冷凍物であった。実施例A1、A2、A3、B1、B2、B5、B7及びF1において、血清または血液は同じ被検体由来であった。

①他の方法

ゲル電気泳動調査に対して、溶出した量のNAの一部を、Aaij及びBorstが記載した(Biochim. Biophys. Acta 269, 1972, 192)緩衝液系に真化工チジウム1μg/mlを含有する中性アガロースゲル上に

いてクローニングされた0.9kb Epstein BarrウイルスDNA断片を含む。緩和環状(CII)分子(relaxed circular molecules)を豊富に含むプラスミド調製物を得るために、pEBV-10 DNA(2.9kb)をDNase Iで処理した。成分Ⅱ分子は、3.2kb緩和環状DNA分子としてビリオン中に存在するB型肝炎ウイルスDNAの精製のためのモデルの役目をする。

pGem3p24は1.45kb HIV配列を含むが、pGem3p24の構成は以下に記述する。

HIV HxB2 DNAの配列は数人が記述している(J. Virol. 61, 633-637(1987); Nature 326, 711-713 (1987); Aids Res. Hum. Retrovirus 3, 41-55(1987); Aids Res. Hum. Retrovirus 3, 33-39(1987)及び Science 237, 888-893(1987))。

HIV HxB2 DNAの一部をFok Iで、もとのHIV HxB2配列の1189及び2613部位で切断した。スクレオチド番号は遺伝子バンク指定を参照されたい。

このフラグメントのFok I部位を、クレノウ

ロードした。ゲルにUV照射して写真撮影した。

いくつかの実験において、既知量の精製DNA(インプットDNA)を臨床試料に加えた。これらのケースにおいて、抽出効率100%に対応する量のインプットDNAを同じゲルにロードした。

Ish-Horowicz及びBurkeが記載したように(Nucleic Acids Res. 9, 1981, 2989)、Escherichia coli HB101から細菌プラスミドDNAを精製し、Sephadex CL 2B(Pharmacia, Inc.)を用いたカラムクロマトグラフィーにかけ、エタノールで沈澱させた。Birnboim及びDolyが記載したように(Maniatis, T. ら, Molecular Cloning, CSH, ニューヨーク)、Escherichia coli JM101(J. Messing, Rec. DNA Techn. Bull. 2:43-48(1979))から細菌プラスミドDNAを精製した。pCMV-Eは、2kbベクターpHC 624(Boros in gene 30, 1984, 257)においてクローニングされた0.4kbヒトサイトメガロウイルスDNA断片を含み、pEBV-10は、同じベクターにお

(Klenow)DNAポリメラーゼ(Maniatis, 上記参照)を使用して充填し、プラスミドpUC-19のポリリンカ-Sma I部位においてクローニングした(Maniatis, 前記参照)。HIV HxB2 DNAフラグメントを担う得られたプラスミドをpUC19-p24と称した。

プラスミドpGem3p24を得るために、pUC19-p24の1450bp EcoRI-BamHIフラグメントをEcoRI-BamHI消化ベクターpGem3においてクローニングした(2867bp; Promega Corporation, Madison USA)。

PCR法に使用したプライマーをオリゴシンセサイザー(oligo-synthesizer)装置(Applied Biosystems製)において合成した。プライマーES47(25mer)及びES75(47mer)のスクレオチド配列を以下に示す。

10 20
ACACCGACAG ATGATACAGT ATTAC

10 20 30 40
AATTCTAATA CCACTCACTA TAGGGCCTCG CTTTAATTT ACTGGTA

ほとんどのRNA単離実験において(実施例A3、B5、B6、D7、C2、D1、E1、F1及びF2)、精製過程のRNAの分解を回避するために溶出用緩衝液中にRNAsinを任意的に使用する以外には、予防策を講じなかつた。臨床試料を試験管に付加する際にのみ手袋をはめ、試薬の調製に対してはRNase阻害剤を使用せず、オートクレーブ処理しないEppendorf容器及びビベットチップを使用した。特に実施例F1及びF2は、溶出の際のRNAsinの存在は厳密には必要でないことを示した。

使用した酵素は市場入手可能であり、製造業者が推奨するままに使用した。RNase A同様に全ての制限酵素T4リガーゼ及びλMV逆転写酵素はBoehringer(Mannheim)製であった。Tag-DNAポリ

(lysing)特性、及びカオトロピック物質GuSCNの存在下にNAを結合するシリカの特性に起因し、かかる方法でNA非含有の緩衝液が得られる。カラム自体は、例えば500°Cまたはそれ以上で1時間以上加熱することにより、核酸非含有にすることができる。

P)DNAタイプ

C I :共有結合閉環状DNA(プラスミド)、

C II :緩和(ニック)環状DNA(プラスミド)、

C III :線状DNA(線状化プラスミド)、

L MW :低分子量DNA(<0.5kb); pUC 624の λ Ipa II消化、471bp、404bp、242bp(2フラグメント)、190bp、147bp、110bp、67bpのフラグメント及び数個のより小さい不定長のフラグメント、

M MW :中分子量DNA(0.5~29kb); ファージλDNAの λ Iind III消化、23kb、9.4kb、6.7kb、4.4kb、2.3kb、2.0kb及び0.56kbのフラグメント

メラーゼはCetus Inc製とした。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)はPerkin Elmer Cetus DNA-熱循環器を用いて実施した。

種々の用途に対しては、本発明の方法に使用する試薬、特にNAキャリヤー(例えばシリカ粒子)及びカオトロピック物質を含む溶解用及び洗浄用緩衝液は、核酸(例えばNA含有の細菌またはウイルス)によって汚染されるべきではないことは基本的に重要である。これは、NAキャリヤーに対しては、これをオートクレーブ内で121°Cで20分間加熱することにより保証され得る。しかしながら、この方法はGuSCN含有の溶解用及び洗浄用緩衝液(GEDTA、L5、L6及びL2)においては、活性が失われる可能性があること、及び環境に対する付随的な危険性があることから有効ではない。上記試薬を(出来る限り)核酸を含有しないようにするために、かかる試薬を本発明のシリカ粒子のカラムに通すことができる。GuSCN含有緩衝液の溶解

ト、

H MW :高分子量DNA(>29kb)、

ssDNA :ファージM13mp9一重鎖DNA(Boehringer)。

(以下余白)

セクションA：ヒトの血清からのDNA/RNAの精製

ヒトの血清には例えばウイルス又は細菌中にNAが存在し得る。これらの有機体は共に遊離形態で生じ得、更には免疫複合物中に結合して生じ得る。NAの量は通常非常に少ないので、アガロースゲル電気泳動及びエチジウムプロミド/NA複合体の紫外線照射を通じての検出は不可能である。DNAをヒトの血清から精製できることを示すために、微量の精製DNAを血清に加え、次いでプロトコルBに基づいてDNAを単離した(実施例A1,A2)。DNA及びRNAをヒトの血清から同時に精製できることを示すために、培養した哺乳動物細胞又は(小さなプラスミドを有する)細菌を血清に加え、次いでプロトコルYに基づいてNAを単離した(実施例A3)。最後に実施例A4は、プロトコルYによりヒトの血清に存在するRNAをHIV(ヒトの免疫不全ウイルス)から精製でき、またPCR法により検出できることを示している。実施例A5は、ヒトの血清中のDNA

(CII)DNAも効率的に単離された。最大MMWフラグメント(約23kb)の収率はより小さなフラグメントと比較して比較的低いようである。このことは他の実験から考慮すると、分子量の大きいフラグメントのせん断のせいであろう。

コントロールレーンはそれぞれ、100%の抽出効率の場合のLMM,CII/CI及びMMW DNAの量を示している。前述した如く、CIIに富む(DNAse Iで処理した)3kbプラスミド(pEBV-10)をインプット材料として使用した。

実施例A2：ヒトの血清から単離したDNAは制限酵素及びT4DNAリガーゼに対して良好な基質であること

精製DNA調製物を50μlのヒトの血清試料12個に加えた。プロトコルBに基づいてこれら12個の混合物からDNAを単離した。50μlのTEで溶離を実施した。溶離したDNAの半分を以下の3種の制限酵素：EcoRI,BamHI,BglII(これらはそれぞれ低塩、

をプロトコルY*により、核酸結合性固相としてのシリカと共に種々のカオトロピック物質を使用して精製できることを示している。

実施例A1：ヒトの血清からのDNAの精製

ヒトの血清(500μl)を既知量の精製DNA[100μl LMM(45μg), 20μl MMW(20μg), 40μl CII(20μg)]と混合し、10個の66μl試料をプロトコルBに基づき10個のDNA抽出物用インプット材料(input material)として使用した。この実験では試験管中に存在するSC(Silica Coarseの懸濁液)の量を2.5~40μlで変動させた。抽出を二重に実施し、各試料からの溶離DNAの半分(30μl)を1%アガロースゲルを支持体とする電気泳動にかけた。比較として、インプットDNAの半分の量を同様にコントロールレーン(lanes)の同一ゲル上にロードした。

SCの量が10μlを越えると、二重鎖DNA、線状(23kb~約60bp)共有結合閉鎖(CI)DNAも緩和環状

中塩及び高塩緩衝液で活性を有する)のいずれかで(二重に)処理するか、T4 DNAリガーゼで処理するか、又は処理しなかった。DNA試料を1%アガロースゲルを支持体とする電気泳動にかけ、紫外線照射により可視化した。

T4リガーゼ処理(37°Cで1時間、30μlの反応容量中に3単位のT4リガーゼ)の結果は、DNAフラグメントの分子量のシフトを示すと共に、ヒトの血清から単離したDNAがエキソヌクレオリティックな(exonucleolytic)分解の影響をそれほど受けないことを示している。

精製プラスミド(pCMV-E; 3.3μg; 1.5μl)を加えた8個の血清試料の結果はそれぞれ、EcoRI,BamHI,BglIIダイジェストに対して全ての制限酵素がプラスミドを線状化したことを示している。全ての制限酵素は9単位の酵素と共に、37°Cで1時間30μlの反応容量中でインキュベートした。

実施例A3：ヒトの血清からのDNA及びssRNAの同

時単離

ヒトの血清には(例えばウイルス、細菌又は細胞中に)、エチジウムプロミドで染色したゲルの紫外線照射によっては検出することのできない非常に少量のRNAしか存在しないので、外因性RNA源をヒトの血清試料に加えた。哺乳動物の細胞又は細菌を外因性RNA源として使用した。プロトコルYに基づいてNAを試料から単離し、RNaseA(40ng/ μl の溶離用緩衝液)の存在下で又は不在下で、0.5U/ μl のRNasinを含む50 μl のTEで溶離した。1%アガロースゲルを支持体とするその後の電気泳動の結果は、RNA及びDNAが検出できることを示している。50 μl の血清試料に対して加えた哺乳動物の細胞は 5×10^5 ラット10B細胞(Boom等、J. Gen. Virol. 69, 1988, 1179)であり、50 μl の血清に対して加えた細菌はプラスミドpCHV-Eを含むE.coli細胞株HB101の100 μl 一晩培養物の細胞ペレットであった。

μl にした。1UのTag-DNAポリメラーゼを加えて、增幅を開始した(1サイクルは95°Cで1分間、55°Cで1分間、72°Cで2分間からなる)。20、25、30、35サイクルで反応混合物から10 μl のアリコートを採取して、2%アガロースゲルに適用した。逆転写酵素で処理した患者FのRNAについては既に25サイクル後に予期される330 bp HIVアンブリマー(amplimer)フラグメントが確認され、HIV RNAが患者の血清に存在することを示唆していた。

実施例A5：数種のカオトロビック物質を用いるDNA精製

50 μl のヒトの血清試料10個を、CI及びCII形態(方法の項参照)からなるそれぞれが10 μg の精製pGem3p24 DNAと混合した。これら10個のプラスミド／血清混合物を、プロトコルY*に基づいて抽出用インプット材料として使用した。使用したカオトロビック物質の濃度については表A5.1を参照のこと。

実施例A4：ヒトの血清から単離したヒトの免疫不全ウイルスRNAの検出用ポリメラーゼ連鎖反応

プロトコルYに基づいて各々が50 μl のヒトの血清試料2個(患者F,H)からNA(75 μl)を単離した。患者Fの血清は(Abbott研究所のHIV P24抗原固相免疫検定法に基づく)多量(2700pg/ml)のHIV抗原P24を含んでいたが、(Abbott研究所のHIV抗体ELISAに基づく)HIV抗体に対しては陰性であった。患者Hの血清は両方の試験で陰性であった。

単離したNAの一部(43 μl)を37°Cで90分RNaseを含まないDNase(Boehringer;1U DNase/ μl)で処理した。エタノールでの沈澱及び68°Cで15分間の熱不活化の後に、RNAを15 μl のTE緩衝液に懸濁した。このRNA調製物の一部5 μl を、HIV特異的プライマーの存在下において、0.4U/ μl のAMV逆転写酵素(42°Cで30分；反応容量20 μl)で処理するか又は処理しなかった。次いで、dNTPsを含む80 μl の1.25 × 濃縮PCR緩衝液を加えて、反応容量を100

抽出後に、各試料から溶離したDNAの25%を0.8%アガロースゲル上で分析した。プラスミドDNA回収の定量化を可能とするために、インプットDNAを同様に同一ゲル上に直接ロードした。

電気泳動後にゲルを紫外線照射下で撮影し、DNA回収効率をプラスミド帯強度(表A5.1の表の説明を参照)を基に視覚的に評価した。

カオトロビック物質としてNaI及びNaSCNを使用して、同様に実験を実施した(下記の試料の説明を参照)。

表A5.1

シリカと共に種々のカオトロビック物質を使用しての、ヒトの血清試料から得られるプラスミドDNAの回収効率

試料番号	使用したカオトロビック物質	pGem3p24:CIIの回収	pGem3p24:CIの回収
1	GUSCN	++	+
2	KI 3M	-	-

3	KI 3M/尿素1M	-	-
4	KI 3M/尿素8M	++	+
5	NaI 3M	-	-
6	NaI 3M/尿素1M	-	-
7	NaI 3M/尿素8M	++	+
8	NaSCN 3M	-	-
9	NaSCN 3M/尿素1M	±	±
10	NaSCN 3M/尿素8M	++	+

表の説明：

表に記載のカオトロビック物質を使用して、前述したように10個の検出可能試料を製造した。

-：回収されない。

±：ほとんど回収されない。

+：目に見えるほど回収される。

++：定量的に回収される。

表A5.1での結果は、8M尿素を組み合わせた3M KI、3M NaI又は3M NaSCNをカオトロビック物質として使用すると、共有結合閉鎖(CI)及び緩和環状(CII)pGem3p24 DNAが効率的に単離されることを

この実験では、試験管に存在するSC(シリカ粗材の懸濁液)の量を2.5~40μlの間で変動させた。抽出を二重に行い、各試料からの溶離DNAの半分(30μl)を、1%アガロースゲルを支持体とする電気泳動にかけた。比較のために、インプットDNAの半分の量を同様に同一ゲル上にロードした。

10μlを越えるSCを使用すると、二重鎖DNA、線状共有結合閉鎖(CI)DNAも緩和環状(CII)DNAもヒトの全血から効率的に単離された。全血から回収されるDNAの量は、約10μlまではSCの量に比例していた。量が多くなると飽和するようである。

実施例B2：ヒトの全血から単離したDNAは制限酵素及びT4 DNAリガーゼに対して良好な基質であること

精製DNA調製物を、50μlのヒトの血液試料12個に加えた。プロトコルBに従ってこれら12個の混合物からDNAを単離した。50μlのTEで溶離が生じた。溶離したDNAの半分を以下の3種の制限酵素

示している。CIIの収率はCIと比較して比較的高いようである。

セクションB：ヒトの全血からのDNA/RNAの精製

1mlのヒトの血液は、核生成せず従って血液のNA量に寄与しない約5×10¹⁰の赤血球を含んでいる。血液のNA量は主に白血球細胞(約4-10×10¹⁰/ml)により決定される。多量のタンパク質(血液中、約70mg/ml)を含む水性媒体(血漿)にこれらの細胞が埋め込まれている。従って、全血はNA精製にとって極めて不純な源である。セクションBの実施例は、にもかかわらずNAをプロトコルB及びYにより全血から単離することができることを示している。

実施例B1：ヒトの全血からのDNAの単離

ヒトの血液(500μl)を、既知量の精製DNA[100μlのLMM(45μg)、80μlのCI/II(40μg)]と混合し、88μlの試料10個をプロトコルBにおける10個のDNA抽出用インプット材料として使用した。

：EcoRI, BamHI, BglIII(これらはそれぞれ低塩、中塩及び高塩緩衝液で活性を有する)のいずれか一つで処理するか、T4 DNAリガーゼで処理するか、又は処理しなかった。DNA試料を1%アガロースゲルを支持体とする電気泳動にかけ、紫外線照射により可視化した。

T4リガーゼ処理(37°Cで1時間、30μlの反応容量中に3単位のT4リガーゼ)の結果は、DNAフラグメントの分子量の増加を示すと共に、ヒトの血液から単離したDNAがエキソヌクレオリティックな分解の影響をそれほど受けないことを示している。

精製プラスミド(pCMV-E; 3.3μg; 1.5μl)を加えた8個の血液試料の結果はそれぞれ、EcoRI, BamHI, BglIIIダイジェストに対して、総ての制限酵素がプラスミドを線状化したことを示している。総ての制限酵素は9単位の酵素と共に、37°Cで1時間30μlの反応容量中でインキュベートした。

実施例B3：10個の異なる血液試料からのDNAの

単離

この実施例では、血液バンクから無作為に選択したヒトの血液の異なる10個の試料を出発材料として使用した。各試料において白血球細胞(WBC)の数は知られていた。プロトコルBに従って $50\mu l$ の試料からDNAを精製し、 $75\mu l$ のTEで溶離が生じた。単離したDNAの三分の一を1%アガロースゲルに直接適用し、残余部分($2\mu l$)をPCR用に使用した。

$3\mu l$ のLMM-DNA($6\mu g$)を $50\mu l$ の各試料に加えた後に、同一の試料で同一の単離作業を実施した。この場合も $25\mu l$ の溶出液(eluate)($75\mu l$)をゲルに直接適用した。 $25\mu l$ の溶出液の他の部分を最初にT4 DNAリガーゼで処理し($37^\circ C$ で1時間、 $30\mu l$ の反応容量中に2U)、次いで同一ゲルに適用した。

血液試料1~10の白血球細胞(WBC)の含量は以下の通りであった。

実施例B5：ヒトの血液からのDNA及びssRNAの同時精製(再現性)

DNA及びRNAを再現し得る形でヒトの血液から精製できることを示すために、一人のヒトから得た各々が $50\mu l$ の6個の血液試料をプロトコルYに基づいて処理し、RNAsin($0.5U/\mu l$)を含む $75\mu l$ のTEでNAを溶離した。溶出液の一部 $25\mu l$ を中性1%アガロースゲルに適用して、電気泳動にかけた。結果は、DNA及びRNAが検出できることを示している。

実施例B6：ヒトの血液(10個の異なる試料)からのDNA及びssRNAの同時精製

10人の異なるヒトから得た $50\mu l$ の血液試料(実施例B3参照)をプロトコルYに基づいて処理し、 $0.5U/\mu l$ のRNAsinを含む $40\mu l$ のTEでNAを溶離した。溶出液の一部 $30\mu l$ を中性1%アガロースゲルを支持体とする電気泳動にかけた。結果は、DNA及びRNAが検出できることを示している。

試料番号	WBC×10 ⁹ /l	試料番号	WBC×10 ⁹ /l
1	4.9	6	8.3
2	5.1	7	8.5
3	5.9	8	9.2
4	6.7	9	10.3
5	7.7	10	10.5

実施例B4：ヒトの白血球細胞中のヒトのβ-グロビン遺伝子検出用ポリメラーゼ連鎖反応

プロトコルBに基づいてヒトの全血から単離したDNAがTag-DNAポリメラーゼに対して良好な基質であることを示すために、実施例B3に従って10個の異なる血液試料から単離した $2\mu l$ のDNAを、 β -グロビン特異的プライマーを含むPCRで処理した。PCRは32サイクルからなり、各サイクルは $94^\circ C$ で1分間、次いで $65^\circ C$ で3分間であった。アンプライマーの一部(50%)を2%アガロースゲルを支持体とする電気泳動にかけた。120 bpのアンプライマー及びプライマー帯を検出することができた。

実施例B7：ヒトの血液からのDNA及びssRNAの同時精製

外因性RNA源をヒトの血液試料に加えた。哺乳動物の細胞又は細菌を外因性RNA源として使用した。プロトコルYに基づいて試料からNAを単離し、RNaseA($40ng/\mu l$ の溶離用緩衝液)の不存在下又は存在下において、 $50\mu l$ TE + $0.5 U/\mu l$ RNAsinで溶離した。 $50\mu l$ の血液試料に対して 5×10^5 ラット1OB細胞(Boom等、J.Gen.Viro., 69, 1988, 1179)を哺乳動物細胞として加え、 $50\mu l$ の血液に対してプラスミドpCMV-Eを含むE.coli細胞株HB101の $100\mu l$ 一晩培養物の細胞ペレットを細菌として加えた。

結果は、哺乳動物のssRNA(18S及び28SリボソームRNA)も細菌株ssRNA(18S及び23SリボソームRNA)もヒトの全血から精製され得ることを示している。

更には、ゲノムDNA及びプラスミド(形態I)DNAが効率的に回収される。

セクションC: ヒト尿からのDNA/RNA精製

ヒトの尿ではNAは、例えばウイルスまたは細菌中や尿路由来の細胞中に存在し得る。量は普通、エチジウムプロミド/NA複合体のアガロースゲル電気泳動及びUV照射による検出が不可能なほど少ない。ヒト尿からDNAを精製し得ることを示すために、マイクログラム量の精製DNAを尿に添加し、続いてプロトコルBに従ってDNAを単離した(実施例C1)。ヒト尿からDNAとRNAとを同時に精製し得ることを示すために、培養した細菌(小プラスミド保有)を尿に添加し、続いてNAをプロトコルBに従って単離した(実施例C2)。

実施例C3は、プロトコルY*により核酸結合性固相としてシリカと共に、GuSCNに替えてKI、NaI及びNaSCNのような別のカオトロビック物質を用いてもヒト尿からDNAを精製し得ることを示す。

実施例C1: ヒト尿からのDNA精製

3μlのLHM DNA(6μg)を、任意に選択した10の、

あれば分解されるだろうと予想できた。従って、分解は精製時にではなく、それ以前の尿/DNA混合物調製時に起こったと考えられる。次の実施例(C2)は、(裸の場合に反して)細胞中に存在するDNAは、特にssRNAまでもが尿試料第10号から有效地に回収できることを示す。

実施例C2: ヒト尿からのDNAとssRNAとの同時精製

この実験では、実施例C1で用いたのと同じ10の尿試料を、2.4kbのプラスミド(pCMV-E)を保有する細菌と混合した。混合物からNAをプロトコルYに従って単離し、かつ75μlのTE緩衝液中に0.5U/μl RNasinを用いて溶解した。溶出物の1/3を1%アガロースゲルでの電気泳動に掛けた。溶出物の別の部分25μlを10Uの、pCMV-Eを直鎖化する制限酵素EcoRIで処理した(反応量30μlにおいて37°Cで1時間)。この処理は40ng/μl RNase Aの存在下に行なった。電気泳動の結果は、23S及び18SリボソームRNA、並びに共有結合で閉じた形態(CI)及

様々な混濁度の50μlヒト尿試料に添加した(試料第4号、第5号、第6号及び第7号は澄明であり、試料第1号、第2号、第3号及び第8号は僅かに混濁し、試料第9号及び第10号は非常に混濁していた)。DNAをプロトコルBに従って単離し、75μlのTE緩衝液で溶解した。各溶出物の1/3を1%アガロースゲルに適用した。別の部分25μlを1.8UのT4 DNAリガーゼで(反応量30μlにおいて37°Cで1時間)処理し、やはり上記ゲルに適用した。マーカーレーンはLHM DNA及びHMM DNAをそれぞれ含有する。マーカーレーン中のLHM DNAの量(2μg)は、抽出効率100%で観察されるべき量を表す。

実験結果は、プロトコルBでヒト尿からDNAを有效地に精製し得、得られるDNAはT4 DNAリガーゼのための優れた基質であることを示す。

尿試料第10号から単離したLHM DNAは明らかに分解されていた。しかし、(この実験で用いたような)裸のDNAは尿試料中にヌクレアーゼが豊富で

び直鎖形態(CII)のプラスミドDNAを示す。

実施例C3: 他のカオトロビック物質を用いるDNA精製

ヒト尿(50μl)を、400μlのカオトロビック物質、溶菌(lysis)緩衝液LG*及び1μgのpGem3p24 DNAと混合した。得られた懸濁液を全部、プロトコルY*によりDNAを精製するべく500μlのカオトロビック物質(表C3.1参照)及び40μlのSiO₂に混合添加した。尿から単離したDNAの量を、アガロースゲル電気泳動を用いて解析した。DNA回収効率を実施例A5に述べたようにして判定した結果を表C3.1にまとめると。

表C3.1

様々なカオトロビック物質をシリカと共に用いて行なった、ヒト糞便試料からのプラスミドDNAの回収
(表A5.1の凡例も参照)

試料番号	使用カオトロビック 物質	pGem3p24 C I の回収	pGem3p24 C II の回収
1	GuSCN/SiO ₂	+	+
2	KI 3M/SiO ₂	+	+
3	NaI 3M/SiO ₂	+	+
4	NaSCN 3M/SiO ₂	+	+

表C3.1は、C I型及びC II型プラスミドDNAのDNAバンドの収率が同じであったことを示す。

実施例D1: ヒト糞便からのロタウイルスdsRNA精製

レオウイルス(Reoviridae)科のウイルスは、二重鎖RNAから成るゲノムを有する。この科に属する重要な病原体は、重症の下痢を惹起し得、従つて糞便試料中に大量に存在するロタウイルスである。ロタウイルスのゲノムは11個のdsRNAセグメントから成り(Hishino in J. Clin. Microbiol.

ヒト血液またはヒト尿に添加し、プロトコルBまたはプロトコルYによって精製した。いずれの抽出作業も4回ずつ行なった。DNAを50μlのTE緩衝液中に溶離し、25μlを1%アガロースゲルでの電気泳動に掛けた。マーカーレーンは500ngのM13 ssDNAを含有する。

この実験の結果から、一重鎖DNAをヒト血液、血清または尿からプロトコルYによって、また程度はより低いがプロトコルBによっても単離できることが判明した。

セクションF: NAのケイ藻土への結合

ケイ藻土の組織はほぼ完全にSiO₂から成るので、ケイ藻土が使用シリカとして有用であるかどうか調べた。5種の異なる市販ケイ藻製品[Janssen Biochimica, Louvain, BelgiumのCelatom FW14, Celatom FW50, Celatom FW60, Celite (AK)及びCelite 521]各10gを50mlの2回蒸留水及び500μlの37% HClと混合し、得られた懸濁液をオートク

21, 1985, 425参照)、これらのdsRNAセグメントはプロトコルBによって糞便上清から単離可能である。下廻試料を12000×gで2分間遠心分離して得た上清100μlを用いて単離を行なった。

ロタウイルスに感染したことが(Wellcomeロタウイルスラテックス試験及びKallestad Path-finderロタウイルス直接抗原検出系によって)確認された6人の異なる患者から採取した試料を用いた結果、dsRNAを抽出できることが判明した。

最初の遠心分離ステップを省略し、糞便試料を直接プロトコルBまたはYのためのインプット物質として直接用いても同様の結果(普通、ロタウイルスdsRNA収率はより高い)が得られた。

実施例E1: ヒト血液、血清及び尿からのssDNA精製

臨床試料から一重鎖DNAも単離できることを示すために、1μg(4μl)の精製ファージM13 DNA(Boehringer社のM13mp9 DNA)を50μlのヒト血清、

レープで20分間121°Cに加熱した。実施例F1及びF2において、上記のように生成した懸濁液をプロトコルYによるNA抽出に用いた。

実施例F1: ヒト血液からのNA単離

ヒト血液を、プラスミドpCMV-Eを保有するE. coli HB101細菌と混合し、一晩経過した培養物100μlの細菌ペレットを50μlの血液に添加した。50μl試料を、プロトコルYによるNA抽出のためのインプット物質として用いた。40μlのSCに替えて、40μlの上記ケイ藻土懸濁液を用いた。NAを75μlのTE緩衝液中に、RNase阻害物質を用いずに溶離し、20μlの溶出物を直接ゲルに付与した。別の20μlの溶出物を、9UのBam HIを伴ったRNase A(40ng/μl)で反応量25μlにおいて37°Cで1時間処理してからゲルに付与した。

マーカーレーンは1μgのMMW DNAを含有する。

得られた結果から、ケイ藻土懸濁液がSCに類似のNA結合特性を有することが判明した。dsDNA(成

分子)とssRNA(23S及び16S rRNA)との両方が結合した。プラスミドDNAは、BamH Iによって完全に直鎖化される(成分Ⅲ)ほど十分に純粋であった。

実施例F2: グラム陰性菌からのNA精製

ヒトにおいて疾病を惹起することが知られている9種類の異なるグラム陰性菌種を固体寒天プレート上で培養した。上記各細菌種を5~10μlずつプレートから搔き取って、プロトコルYによるNA抽出のためのインプット物質として用い、また40μlのSCかまたは40μlのCelite 521懸濁液をNAキャリヤーとして用いた。

SCを用いた抽出は最初の洗浄の間に停止しなければならなかったが、これは、たとえ(3分を越える)長時間渦形成を行なったとしてももはやNAシリカ複合体を均質化し得なくなつたからである。他方、Celite 521を用いた抽出は問題無く続行することができたが、これはおそらくケイ藻土の粒

径がSC粒子の粒径より大きかったためであろう。NAを70μlのTE緩衝液で、RNasinを用いずに溶離し、溶出物の一部(20μl)を1%アガロースゲルでの電気泳動に掛けた。

マーカーレーンは1μgのMMW DNAを含有する。

次のような細菌に関する結果を得た。

- 1: Campylobacter pylori
- 2: Yersinia enterolytica type 3
- 3: Neisseria meningitidis
- 4: Neisseria gonorrhoeae
- 5: Haemophilus influenzae type b
- 6: Klebsiella pneumoniae
- 7: Salmonella typhimurium
- 8: Pseudomonas aeruginosa
- 9: Escherichia coli K1-083

この方法で、MMW細菌DNA及びrRNAを検出することができた。

セクションG: Escherichia coli JM101のDNA/RNA

精製

グラム陰性菌からのNAの単離が、本発明により可能である。細菌細胞中には、高レベルの高分子量DNA(MMW DNA)及びリボソームRNAが存在する。実施例G1は、細菌細胞からNAを、NA結合性固相としてシリカと共に様々なカオトロピック物質を用いて精製できることを示す。

実施例G1: NA結合性固相として様々なカオトロピック物質及びシリカを用いて行なう細菌細胞からのNA単離/精製(内在)

一晩経過した細菌培養物JM101 50μlからNAを、900μlのカオトロピック物質及び40μlのSiO₂の存在下に単離した。高レベルのMMW DNA及び内在リボソームRNA(16S及び23S)が、エチジウムプロミドで染色したゲルのUV照射によって単離NAを検出することを可能にする。単離はプロトコルY*に従って行ない、溶出NAの25%(40μl部分)をアガロースゲル上で解析した。

表G1

様々なカオトロピック物質をシリカと共に用いて行なう細菌細胞試料からのMMW DNA及びrRNA単離の相対効率

試料番号	使用カオトロピック物質	MMW DNA回収の相対効率	rRNA回収の相対効率
1	3M KI	1	>1
2	3M NaI	1	1
3	3M NaSCN	1	1

凡例:

アガロースゲル解析の結果を表G1にまとめる。MMW DNA及びrRNA回収の定量を、シリカと共に用いるカオトロピック物質がGuSCNであった場合と比較した。表G1中の“1”は、DNAまたはRNA回収の効率が同等であることを表す。表G1中の“>1”は回収効率がより高いことを表す。

細菌細胞からの内在RNA単離のための基準として、E. coli rRNAマーカー(Boehringer)を用いた。

セクションH: カオトロピック物質としてグアニジニウムチオシアネートと、NAを結合させ得る別の固相とを用いるDNA精製

GuSCN及び幾つかのシリカ誘導体またはラテックス粒子(“材料及び方法”参照)を用いてNA単離

/精製を行ない得ることを示すために、純粋なプラスミドを低塩緩衝液(Tris 10mM-EDTA 1mM, pH 8.0)に添加し、その後プロトコルYに従って単離したが、その際ステップ7及び9は省略した(TEでの溶離を行なわなかった)。結合したNAを伴ったシリカ/ラテックス粒子をPCR反応混合物中に導入した。単離したDNAはPCR法によって検出し得る。実施例II1は、カオトロビック物質としてのGuSCNと共に別の固相を用い、かつPCR法で検出を行なうことによってNAを精製し得ることを示す。

実施例II1: GuSCN及び別の固相を用いるDNA精製

50μlのTris 10mM/EDTA 1mM(pH8.0)中に存在する0.5μgのpGem3p24を、80μlのシリカ懸濁液または80μlのラテックス懸濁液(“材料及び方法”参照)及び900μlの溶菌緩衝液L6と混合した。

プロトコルYにより洗浄し、かつ56°Cで乾燥した後(溶離ステップ省略)、ペレットを50μlの水に再懸濁した。プラスミドシリカ懸濁液の20

μl部分を、HIV特異的プライマー(“材料及び方法”参照)の存在下にPCR混合物中に用い、5μlの10倍濃縮PCR緩衝液と、1μlの10mM dNTPと、2単位のTag DNAポリメラーゼと、最終量を50μlとする量の水とを添加して増幅反応を開始させた(95°Cで1分、37°Cで1分、更に72°Cで3分を1周期とする)。

30周期後、反応混合物から10μlアリコートを取り分け、2%アガロースゲル上で解析した。ラテックス粒子でNAを単離した場合、シリカで単離した場合のようなペレットは得られなかった。

1mlの洗浄液L2を300μlの70% EtOHと混合したところ、二つの液間にラテックス含有バンドが見いだされた。ラテックス粒子はその色によって検出可能である。単離したラテックス含有画分を70% EtOHで2回洗浄し、遠心分離すると、該画分はEppendorff管内で小さいペレットを形成した。

表II1

カオトロビック物質としてグアニジニウムチオシアネートと共に別の固相を用いて単離したDNAの、PCR増幅及びゲル解析による検出

試料番号	NA結合性固相	増幅後のHIV p24 DNA (LMW DNA)の検出レベル
1	粗シリカ(対照)	++
2	12 MAAM-C2	+
3	12 MAAM-C3	+
4	12 MAAM-C4	+
5	12 MAAM-C6	++
6	12 MAAM-C8	+
7	12 MAAM-C10	+
8	12 MAAM-C18	++
9	VQ 69 (疎水性)	++
10	VQ 58B (疎水性)	++
11	AGY 1515 (親水性)	+
12	ACF 27C (親水性)	+
13	ACN3red (親水性)	+

凡例:

結果を表II1にまとめた。30周期後、予想した290bp HIVアンプライマーフラグメントを経ての事例で観察した。フラグメントのサイズを、やはりゲル上に載置したマーカーφX 174 RF DNA Hae III digest (Pharmacia)と比較した。

++: 固相として粗シリカを用いた場合(対照)と同じレベルのHIV特異的290bpフラグメントをアガロースゲル上に検出したことを表す。

+: 290bpフラグメントの検出レベルが対照の粗シリカの場合より低いことを表す。

セクションI: NA結合フィルター及びGuSCNを用いる精製

プロトコルY**による核酸の単離では、SiO₂の替わりにNA結合フィルター(“材料及び方法”参照)を用い得る。

低塩緩衝液(Tris 10mM-EDTA 1mM, pH8.0)中では通常DNAの放出が起こらないが、場合によって生起するこの問題点は、DNAを結合させたフィルターからDNAを溶離する替わりに該フィルターをPCR反応混合物中に插入することによって排除できる。実施例II1は、NA結合フィルター及びカオトロビック物質としてのGuSCNを用い、かつPCR法で解析することによってNAを精製し得ることを示す。

実施例II1: DNA結合フィルターを用い、かつPCR増幅による検出を行なうDNA単離/精製

Tris 10mM/EDTA 1mM(pH8.0)50μl中の純粋なpGem3p24 DNA(濃度1μg, 0.01μg及び0.005μg)を、寸法1cm×1cmの3個のDNA結合フィルター及び

900 μl の GuSCN(溶菌緩衝液 L6)に添加した。

表II

(アプロトコルY**による)洗浄(遠心分離ステップ省略)及び56°Cでの乾燥の後、DNAを結合させたフィルターを直接PCR混合物中に導入した。HIV特異的プライマーの存在下に、PCRサイクラーで増幅を行なった。

反応混合物は更に、5 μl の10倍濃縮PCR緩衝液と、1 μl の10 mM dNTPと、2単位の *Taq* DNAポリメラーゼと、最終量を50 μl とする量の水とを含有する。続いて、増幅反応を開始させた。

30周期後、反応混合物から10 μl アリコートを取り分け(実施例H1参照)、2%アガロースゲル上で解析した。

カオトロピック物質としてのGuSCNと共に別のNA結合固相としてフィルターを用いて単離したDNAの、PCR増幅及びゲル解析による検出

試料番号	NA結合性固相	インプットDNA量	増幅後のHIV p24 DNAの量
1	Hybond N	1.0 μg	+
2	Hybond N	0.01 μg	0
3	Hybond N	0.005 μg	0
4	ニトロセルロース	1.0 μg	+
5	ニトロセルロース	0.01 μg	0
6	ニトロセルロース	0.005 μg	0
7	PVDF-millipore	1.0 μg	++
8	PVDF-millipore	0.01 μg	+
9	PVDF-millipore	0.005 μg	+

凡例:

結果を表IIにまとめた。予想した290bp HIVアンプライマーフラグメントを観察した。フラグメントを市販 ϕX Hae II と比較した。

++: アガロースゲル上で、エチジウムプロミドで強度に染色された290bpフラグメントを検出

+: 290bpフラグメントを検出

0: 290bpフラグメント検出せず

比較として: PCR増幅混合物に添加した7ngの精製pGem3p24 DNAは、“++”として定量される290bpフラグメントをもたらす。

第1頁の続き

②発明者 テイム・キエフィツ オランダ国、2593・ヘー・エー・デン・ハーグ、スタイル

エサントストラート・183

②発明者 ベテル・フランクリン・レンス オランダ国、1015・ヘー・カー・アムステルダム・ブラウエルスフラフト・823